

553, 118

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年10月28日 (28.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/092357 A1

(51)国際特許分類⁷: C12N 5/06, (74)代理人: 高島一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
5/10, 15/09, A61K 48/00, A01K 67/027 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/004612

(22)国際出願日: 2004年3月31日 (31.03.2004)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2003-110821 2003年4月15日 (15.04.2003) JP(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 社
団法人芝蘭会 (SHIRANKAI KYOTO UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE ALUMNI ASSOCIATION
INC.) [JP/JP]; 〒6068302 京都府京都市左京区吉田牛
の宮町11-1 Kyoto (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 篠原 隆司 (SHI-
NOHARA, Takashi) [JP/JP]; 〒6068351 京都府京都市
左京区岡崎徳成町23-6-1浦マンション4-B号
室 Kyoto (JP). 篠原 美都 (SHINOHARA, Mito) [JP/JP];
〒6068351 京都府京都市左京区岡崎徳成町23-6
-1浦マンション4-B号室 Kyoto (JP).(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

A1

(54)Title: METHOD OF GROWING SPERM STEM CELLS *IN VITRO*, SPERM STEM CELLS GROWN BY THE METHOD,
AND MEDIUM ADDITIVE KIT TO BE USED IN GROWING SPERM STEM CELLS *IN VITRO*

WO 2004/092357 A1

(54)発明の名称: 精子幹細胞の生体外における増殖方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および精子
幹細胞の生体外増殖に用いられる培地添加剤キット(57)Abstract: It is intended to provide a method of growing sperm stem cells of a mammal or the like *in vitro* characterized in
that glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) or its equivalent and leukemia inhibitory factor (LIF) are added to a medium (a
culture liquor) for culturing sperm stem cells.(57)要約: 本発明は、哺乳類などの精子幹細胞を生体外 (*in vitro*) で増殖させる方法であって、精子幹細胞を培
養するための培地 (培養液) に、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因
子 (LIF) が含まれるという点を特徴とする方法を提供する。本発明の方法によれば、精子幹細胞を発生工学
的に利用可能な程度に生体外で増殖させることができる。

明細書

精子幹細胞の生体外における増殖方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および精子幹細胞の生体外増殖に用いられる培地添加剤キット

5

技術分野

本発明は、哺乳類などの精子幹細胞を生体外 (*in vitro*) で増殖させる方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および、精子幹細胞の生体外での増殖に用いられる培地添加剤キット、当該精子幹細胞を用いたトランスジェニック動物の製造方法等に関するものである。

背景技術

哺乳類精巣の精子幹細胞は、成体で無限に増殖し続け、減数分裂を経て精子形成に至る源となる細胞である。精子幹細胞は次世代へ遺伝子を引き継ぐために分配される。成体における唯一の幹細胞であるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーに有用である。

Brinster らは、1994年に *in vivo* で精子幹細胞を移植することに成功した (『Brinster RL, Zimmermann JW, Spermatogenesis following male germ-cell transplantation, Proc Natl Acad Sci USA, 1994年、91巻、11298-11302頁』参照)。この方法では精巣を形成する精細管内に幹細胞を移植するとコロニーをつくり、ドナー細胞由来の精子形成を起こし、仔をつくることができるというものである。これによって、ES細胞以外にも生殖系列細胞を操作する新しい可能性が切り開かれ、精子幹細胞を用いた発生工学という新しい分野が確立された。さらに、最近の研究では、いくつかの精子幹細胞が試験管内で3ヶ月以上生存可能であるということが報告されている (『Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL, Culture of mouse spermatogonial stem cells, Tissue Cell, 1998年、30巻、389-397頁』参照)。そして、『Feng L-X, Chen Y, Dettin

L, Reijo Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M、Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line, *Science*、2002年、297巻、392-395頁」、「van Pelt AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, van Dissel-Emiliani FMF、Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics、*Endocrinology*, 2002年、143巻、1845-1850頁」や特表2001-517927号公報（公表日：平成13年10月9日）では、精子幹細胞を増殖させたり、長期的に維持したりする方法について記載されている。

ところで、昨今種々のバイオテクノロジー技術を利用して、トランスジェニック動物（特にノックアウト動物）を作製する方法が開発され、ノックアウトの作製や家畜の品種改良などに利用されている。このトランスジェニック動物を作製する方法としては、例えば体細胞核移植法、ES細胞を用いる方法、前核への遺伝子注入法などが挙げられる。

体細胞核移植法は、現在のところ、ウシやブタなどの家畜でノックアウトができる唯一の方法であると考えられるが、非常に効率が悪く奇形も多く、それに伴って費用も高いという問題点を有している。

ES細胞を用いる方法は、ノックアウトが簡単に効率よく作製できるということから、現在マウスにおいては有効に利用されている。しかしながら、マウス以外（例えば、ブタやウシなどの家畜や靈長類）では、生殖細胞をつくる能力を有するES細胞が採れておらず、この手法によるノックアウトは未だ報告されていない。また、ES細胞を用いて生殖系列の細胞を作製する場合には、ES細胞が生殖系列以外の細胞に分化し、生殖細胞形成能を失いやすいという問題点も有している。

また、前核への遺伝子注入法は、マウスのトランスジェニック作製においては標準的な方法であり実用化されている。しかしながら、マウス以外の動物では、その成功率は非常に低く（例えば、ブタでは1%前後、ウシでは1%以下）、非常にコストがかかり現実的ではない。

このようなトランスジェニック動物の作製において、上述の精子幹細胞を利用することができれば、幹細胞は無限の増殖能力を持つため、ES細胞と同様の手法が適用でき、簡単に効率よくノックアウトを作製することができると期待されている。

5 しかし、これらの細胞を試験管内で実用可能なレベルまで増殖させ、操作するという試みについては、未だ成功例はない。

具体的には、「Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL, Culture of mouse spermatogonial stem cells, *Tissue Cell*, 1998年、30巻、389-397頁」に記載の方法では、精子幹細胞が *in vitro* で 3 ヶ月以上存続するこ
10 とが報告されているが、幹細胞が増殖したという根拠は示されていない。また、特表 2001-517927 号公報や「Feng L-X, Chen Y, Dettin L, Reijo Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M, Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line, *Science*, 2002年、297巻、392-395頁」、「van Pelt AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, van
15 Dissel-Emiliani FMF, Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics, *Endocrinology*, 2002年、143巻、1845-1850頁」などに記載された培養方法では、精子幹細胞に安定して外来遺伝子を導入するこ
とができるないという問題点、当該精子幹細胞由来の子孫が得られないという問題
20 点がある。上述の培養方法を用いて、精子幹細胞を試験管内で培養しても、生存可能ではあるが、1週間でもとの細胞数の 20% 程度に減ってしまうというのが現状であり、細胞を増殖させることは不可能である。このように、従来の手法では、精子幹細胞を操作してバイオテクノロジーなどに応用しようとするには限界がある。また、試験管内で長期間持続的に培養された精子幹細胞を用いて、精子形成が実際に行われた例はこれまでに報告されていない。

発明の開示

本発明は上述の問題点に鑑みて成されたものであり、生体実験、医学的研究、

バイオテクノロジーに有効に利用することのできる精子幹細胞を、発生工学的に利用可能な程度に生体外で増殖させる方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および精子幹細胞の生体外増殖に用いられる培地添加剤キットを提供するものである。

5 本願発明者らは、精子幹細胞の生体外 (in vitro) での増殖法について銳意検討した。そして、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) の存在下で、新生児マウスの精巣から単離された精子幹細胞を培養させると、5ヶ月以上の期間にわたって増殖 (10^{14} 倍) させることができることを見出した。さらに、培養された精子幹細胞を精細管に移植 10 したところ、先天的に生殖力のないマウスの生殖力を回復することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本願は以下に関する。

(1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴とする精子幹細胞の増殖方法。

(2) 上記培地には、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) のうちの少なくとも何れかがさらに含まれることを特徴とする上記 (1) 記載の精子幹細胞の増殖方法。

(3) 上記培地には、血清がさらに含まれることを特徴とする上記 (1) または (2) 記載の精子幹細胞の増殖方法。

(4) さらにフィーダー細胞を用いることを特徴とする上記 (1) ないし (3) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

(5) 哺乳類由来の精子幹細胞を用いることを特徴とする上記 (1) ないし (4) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

25 (6) 上記グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物は、濃度 0.5 ~ 50 ng/m¹ で上記培地中に含まれることを特徴とする上記 (1) ないし (5) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

(7) 上記白血病抑制因子 (L I F) は、濃度 $10^2 \sim 10^4$ units/m l で上記培地中に含まれることを特徴とする上記 (1) ないし (6) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

5 (8) 上皮細胞成長因子 (E G F) は、濃度 0. 5 ~ 50 ng/m l で上記培地中に含まれることを特徴とする上記 (2) ないし (7) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

(9) 上記塩基性纖維芽細胞成長因子 (b F G F) は、濃度 0. 5 ~ 50 ng/m l で上記培地中に含まれることを特徴とする上記 (2) ないし (8) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

10 (10) 上記血清は、上記精子幹細胞の培養開始時の培地中には、濃度 0. 1 ~ 5 (v/v) % で含まれ、上記精子幹細胞を継代した後の培地中には、濃度 0. 1 ~ 20 (v/v) % で含まれることを特徴とする上記 (3) ないし (9) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

15 (11) 上記フィーダー細胞は、培養開始から遅くとも 4 週間経過後には用いられるることを特徴とする上記 (4) ないし (10) の何れかに記載の精子幹細胞の増殖方法。

(12) 上記 (1) ないし (11) の何れかに記載の増殖方法を用いて、生体外で増殖された精子幹細胞。

(13) 上記 (12) 記載の精子幹細胞を含んでなる不妊治療剤。

20 (14) グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F) 又はその均等物と、上皮細胞成長因子 (E G F)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (b F G F) のうちの少なくとも何れか一方を含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用される培地添加剤キット。

25 (15) 白血病抑制因子 (L I F) をさらに含むことを特徴とする上記 (12) 記載の培地添加剤キット。

(16) 血清をさらに含むことを特徴とする上記 (14) または (15) 記載の培地添加剤キット。

(17) 不妊治療剤を製造するための、上記(12)記載の精子幹細胞の使用。

(18) 上記(12)記載の精子幹細胞を用いる、不妊の治療方法。

(19) 以下の工程を含む、移植された精子幹細胞に由来する精子を形成する非ヒト動物の製造方法：

5 a) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
b) a)で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程。

10 (20) 以下の工程を含む、精子の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
b) a)で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程。

(21) 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する胚の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
b) a)で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程；
d) 当該精子を卵細胞に受精させ、胚を得る工程。

25 (22) 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する非ヒト子孫の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子

幹細胞を増殖させる工程；

- b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
- c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程；
- 5 d) 当該精子を卵細胞に受精させ、胚を得る工程；
- e) 当該胚を偽妊娠した雌の輸卵管に移入し、非ヒト子孫を得る工程。

(23) 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する非ヒト子孫の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

- b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
- c) 当該非ヒト動物を雌と自然交配し、非ヒト子孫を得る工程。

(24) 以下の工程を含む、外来遺伝子が導入された精子幹細胞の製造方法：

- 15 a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
- b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程。

(25) 以下の工程を含む、外来遺伝子が導入された精子の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
- b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程；
- c) 当該精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行い、外来遺伝子が導入された精子を得る工程。

(26) 以下の工程を含む、トランスジェニック非ヒト動物の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

5 b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程；

c) 当該精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行い、外来遺伝子が導入された精子を得る工程；

d) 当該精子を卵細胞に受精させ、トランスジェニック非ヒト動物を得る工程。

10 (27) トランスジェニック非ヒト動物がノックアウト非ヒト動物である、上記 (26) 記載の製造方法。

以上のように、本発明の精子幹細胞の増殖方法は、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴としている。

15 上記の方法によれば、これまで生体外 (すなわち、*in vitro*) で長期間増殖させることができなかつた精子幹細胞を増殖させることが可能となる。これによつて、各分野への応用が期待されていながら、これまで効率的な増殖方法が見つかりていなかつたために、その応用範囲が制限されていた精子幹細胞を有効に利用することが可能となる。

20 そして、上記の方法によって得られた本発明の精子幹細胞は、実用可能なレベルにまで増殖されたものであるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。

図面の簡単な説明

25 図1の (a) ~ (e) は、実施例1において、新生児マウスの精巣細胞からG S細胞コロニーへの発達を顕微鏡で観察した結果を示す図である。(a) では、1 DIV後にゼラチンコートされたプレートから集められた浮遊細胞を示す。

(b) では、4 D I Vにおいて、細胞が小さなコロニーを形成し始める様子を示す。(c) では、8 D I VでのG S細胞コロニーを示す。(d) では、95 D I VでのM E F フィーダー細胞上のG Sコロニーを示す。(e) では、95 D I Vでの増殖する細胞による鎖形成を示す。

5 図2は、実施例1において培養されたG S細胞の増殖を示すグラフであり、具体的には、G F P標識でフィーダー細胞と区別できるG S細胞の数を測定したものである。

10 図3の(a)～(f)は、実施例1において、各分子マーカーを用いて、フローサイトメトリーによって培養細胞の性質を調査した結果を示すグラフである。なお、(a)～(f)に示す各グラフは、分子マーカーとして、(a)から順に、 α 6-インテグリン、 β 1-インテグリン、E p C A M、E E 2、c-kit、S S E A-1をそれぞれ用いた場合である。

15 図4は、実施例1における、精原細胞移植後のG S細胞からの精子形成および子孫作製の結果を示す図である。(a)は、G F P標識されたドナーG S細胞由来の受容体(レシピエント)精巣を観察した結果である。(b)および(c)は、W受容体(レシピエント)精巣の組織学的な観察結果を示すものであり、(b)では正常は精子形成を、(c)では成熟した精子をそれぞれ示す。(d)は、U V照射下で蛍光を示すG F P標識されたG S細胞由来の子孫を示す。

20 図5は、実施例2において、E G F P遺伝子を導入した精子幹細胞と、当該精子幹細胞を用いて製造されたトランスジェニック動物由来の染色体D N Aを、サンプロッティングにより解析した結果である。レーン1はE G F P遺伝子を導入した精子幹細胞由来の染色体D N Aを、レーン2～4は当該トランスジェニック動物由来の染色体D N Aを示す。全てのレーンにおいてE G F Pプローブの特異的ハイブリダイゼーションである7. 3 k bおよび4. 4 k bのバンドが観察25された。

図6は、実施例2により製造されたトランスジェニック動物の、U V照射下における観察結果を示す。培養細胞に導入されたトランスジーン由来のE G F P

の蛍光が観察された。

図7は、実施例3において、GDNFを含まずノルトリン(Neurturin)を含む培地(a)又はGDNFおよびノルトリンを含まない培地(b)を用いて増殖させた精子幹細胞のコロニーの観察結果を示す。図中右下のバーは100μmに相当する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の精子幹細胞の増殖方法は、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴としている。

すなわち、上記の精子幹細胞の増殖方法の特徴点は、精子幹細胞を培養するための培地(培養液)に、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物、および白血病抑制因子(LIF)が含まれるという点であると言える。それゆえ、本発明に係る増殖方法を実施するために精子幹細胞の培養を行う場合に、当該特徴点以外の培養条件については、従来公知の方法に従って行うことができる。

本発明において、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の均等物とは、ノルトリン(Neurturin)、ペルセフィン(Persephin)、アルテミン(Artemin)等のGDNF様化合物、GDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)に対してグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)およびGDNF様化合物と同様の作用を有する他の化合物(例えばGDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)を特異的に認識する抗体、GDNFレセプター(群)または補助レセプター(群)に対する作動性化合物等)を含む概念である。このようなレセプター(群)または補助レセプター(群)には、それぞれRetチロシンキナーゼおよびGDNF-ファミリーレセプター α :sが含まれる。

GDNF様化合物とは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)と類似の構造を有するか、あるいはそのレセプターまたは補助レセプターに対してグリア細

胞由来神経栄養因子 (GDNF) のように作用する化合物を意味する。GDNF 様化合物としては、特に、ノルトリン、ペルセフィン、アルテミン等が挙げられる。

5 グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) およびGDNF 様化合物は構造的に類似し、cRet レセプターチロシンキナーゼは、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、ノルトリン、ペルセフィンおよびアルテミンの共通するシグナル伝達レセプターとして作用する。

10 「グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) のように作用する化合物」とは、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) のシグナルを伝達するレセプターまたはその補助レセプターに対し、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) と同様に作用する化合物を意味する。

15 「GDNF レセプター」とは、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) またはGDNF 様化合物の結合物質、すなわち、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) またはGDNF 様化合物のシグナルを伝達可能な化合物を意味する。「GDNF レセプター」としては、特に、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) またはGDNF 様化合物のシグナル媒介性レセプターである cRet レセプターチロシンキナーゼが挙げられる。

20 「GDNF 補助レセプター」とは、GDNF またはGDNF 様化合物のシグナルを伝達しないが、GDNF またはGDNF 様化合物のシグナルを伝達するレセプターを活性化するレセプターを意味する。このような化合物は、特に、そのメンバーがGDNF ファミリーレセプター α : s (GFR α) と称されるレセプターである。これらはまた、GDNF、ペルセフィン、アルテミンおよびノルトリンのシグナル伝達レセプター複合体 (signaling receptor complex) と関係する。該ファミリーのレセプターとしては4 メンバー (GFR α 1 ~ 4) (Jing, S., et al., Cell, 85, 9-10 (1996); Jing, S. Q., et al., J. Biol. Chem., 272, 25 33111-33117 (1997); Treanor, J. J., et al., Nature, 382, 80-83 (1996); Subanto, P., et al., Human Molecular Genetics, 6, 1267-1273 (1997)) が既

知である。これらは独立してシグナルを伝達することができるが、すべてがリガンド結合および c R e t 活性化に不可欠である。

上記の方法によれば、これまで生体外（すなわち *in vitro*）で長期間培養させることができなかつた精子幹細胞を培養させることができ可能となる。これによって、
5 各分野への応用が期待されていながら、これまで効率的な増殖方法が見つかっていなかつたために、その応用範囲が制限されていた精子幹細胞を有効に利用することが可能となる。

具体的には、精子幹細胞は、トランスジェニック動物の作製、ヒトの男性の不妊治療および不妊薬剤、ヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療のための研究
10 および薬剤の開発などに応用可能である。そして、これらの応用方法には、精子幹細胞の増殖というステップが必須のものであるため、本発明の精子幹細胞の増殖方法が非常に有効であり、利用価値が高いと言える。

本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、上記培地中に、上皮細胞成長因子
15 (EGF)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) のうちの少なくとも何れかがさらに含まれることが好ましい。

一般に、幹細胞の培養には、EGF および bFGF のうちの何れかが含まれることによって、安定した細胞の培養を実施できる。それゆえ、本発明の場合にも、
EGF および bFGF のうちの何れかを少なくとも含むことによって、安定した精子幹細胞の培養を行うことができる。

20 本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、上記培地は、血清をさらに含むことができる。血清としては、自体公知のものを用いることができ、特に限定されないが、例えば仔ウシ血清 (FCS) 等が好適に用いられる。

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、精子幹細胞はフィーダー細胞を用いて培養されてもよい。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、
25 例えばマウス胎児纖維芽細胞 (MEF) 等が好適に用いられる。

本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、哺乳類由来の精子幹細胞を用いることが好ましい。

上記哺乳類としては、例えば、マウス、ラット、ウサギなどの実験動物、ブタ、ウシ、ヤギなどの家畜、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることができる。上記実験動物は、文字通り医薬品などの開発のための実験用動物として有用である。上記家畜もまた食用などに用いられ、人間生活にとって有用である。また、霊長類は、分類学的にヒトにより近く、ヒトにおける種々の疾病的メカニズムの解明や、生殖細胞の分化のメカニズムの解明などに利用できるため、有用である。

10 このように、上記の方法によれば、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジー、畜産などといった種々の分野で有用な哺乳類において、その精子幹細胞を増殖させることができると、その価値は高いと言える。

本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物は、通常濃度 $0.05\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $100\text{ ng}/\text{mL}$ 、例えば $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $100\text{ ng}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $10\text{ ng}/\text{mL}$ 、より好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $1\text{ ng}/\text{mL}$ 、更に好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $200\text{ ng}/\text{mL}$ 、いっそより好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $50\text{ ng}/\text{mL}$ で上記培地中に含まれる。

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記白血病抑制因子 (LIF) は、通常は濃度 $10\text{ units}/\text{mL}$ ~ $10^6\text{ units}/\text{mL}$ 、例えば $10\text{ units}/\text{mL}$ ~ $10^5\text{ units}/\text{mL}$ 、好ましくは $10^2\text{ units}/\text{mL}$ ~ $10^4\text{ units}/\text{mL}$ で上記培地中に含まれる。

20 さらに、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上皮細胞成長因子 (EGF) が上記培地中に含まれる場合、その濃度は、通常濃度 $0.05\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $10\text{ ng}/\text{mL}$ 、例えば $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $100\text{ ng}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $10\text{ ng}/\text{mL}$ 、より好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $1\text{ ng}/\text{mL}$ 、更に好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $200\text{ ng}/\text{mL}$ 、いっそより好ましくは $0.5\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $50\text{ ng}/\text{mL}$ である。

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) が上記培地中に含まれる場合、通常濃度 $0.05\text{ ng}/\text{mL}$ ~ $1\text{ ng}/\text{mL}$

0.0 mg/m¹、例えば0.5 ng/m¹～100 μg/m¹、好ましくは0.5 ng/m¹～10 μg/m¹、より好ましくは0.5 ng/m¹～1 μg/m¹、更に好ましくは0.5～200 ng/m¹、いっそうより好ましくは0.5～50 ng/m¹である。

5 また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記血清が上記培地中に含まれる場合、当該血清は、上記精子幹細胞の培養開始時の培地には、濃度0.1～5 (v/v) %で含まれ、上記精子幹細胞を継代した後の培地中には、濃度0.1～20 (v/v) %で含まれることが好ましい。

精子幹細胞を培養するための上記培地が、上述のような濃度で各因子 (GDNF又はその均等物、EGF、bFGF、LIF、および血清) を含むことによつて、精子幹細胞の培養をより安定して、精子幹細胞の増殖率を高めることができる。

さらに、本発明の精子幹細胞の培養方法において、上記フィーダー細胞は、培養開始から遅くとも4週間経過後には用いられることが好ましい。

15 上記の方法によれば、精子幹細胞がフィーダー細胞に接着し、効率的にコロニー形成を行うことができる。

本発明の精子幹細胞は、上述の各増殖方法によって生体外 (すなわち、*in vitro*) で増殖されたものである。

上記の精子幹細胞は、上述の増殖方法によって実用可能なレベルにまで増殖されたものであるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。

なお、上記の精子幹細胞の利用方法の一例として、ヒト男性の不妊治療のための薬剤として利用する方法が挙げられる。それゆえ、上記の精子幹細胞を含んでなる不妊治療剤も本発明に含まれる。

25 また、本発明の培地添加剤キットは、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物と、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) のうちの少なくとも何れか一方とを含んでなり、精子幹細胞を生体外で

増殖させるための培養培地に添加して使用されるものである。

上記の構成によれば、精子幹細胞の *in vitro* での培養用培地に添加することによって、従来は増殖させることができた精子幹細胞を大幅に培養させることができる。なお、精子幹細胞の培養開始時には、上記の GDNF 又はその均等物および、EGF および／または bFGF という各因子以外に、LIF が必須の因子となる。上記の培地添加剤キットは LIF を含まないため、精子幹細胞の培養が確立された後の培養を維持する場合の培地添加剤キットとして（すなわち、継代後の培養用培地の添加剤キットとして）、利用することが好ましい。

また、精子幹細胞の培養開始時に、上記の培地添加剤キットを用いる場合には、上記培地添加剤キットとは別に LIF を添加して利用するということも可能であるが、上記培地添加剤キットに、白血病抑制因子（LIF）がさらに含まれていてもよい。

また、上記培地添加剤キットには、上記血清がさらに含まれていてもよい。

上記の構成によれば、精子幹細胞の培養開始時に、培地調製を簡便化する培地添加剤キットとして好適に利用することができるとともに、上記の培地添加剤を精子幹細胞の培養維持における培地中に添加すれば、精子幹細胞の増殖効率をより高めることができる。

以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

本実施の形態では、特に哺乳類の精子幹細胞の *in vitro* での増殖方法について説明する。この哺乳類の精子幹細胞の増殖方法は、培養培地にグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）、白血病抑制因子（LIF）、および血清として仔ウシ血清（FCS）を含み、フィーダー細胞としてマウス胎児纖維芽細胞（MEF）を用いて増殖を行うものである。

より具体的にマウスの精子幹細胞を例に挙げれば、本実施の形態の精子幹細胞の増殖方法は、以下の（1）～（5）に示す手順に従って実施することができる。

(1) 生直後のマウスの精巢をコラゲナーゼ、トリプシン、DNaseでバラバラに分解する。

(2) single cell になった（分散された）精巢の細胞をゼラチンコートしたプレートのうえに播く。このときに用いる培養液（すなわち、培地）な、例えは、
5 StemPro-34 をベースにしたものであり、当該培養液中には、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）、および白血病抑制因子（LIF）という複数の細胞増殖因子、および仔ウシ血清（FCS）が含まれる。

(3) 培養開始後、10日から2週間でトリプシン処理を行い、1倍又は1/2
10 倍の濃度で細胞を継代する。

(4) (3) に示す継代を2~3回繰り返した後、今度は、フィーダー細胞であるマウス胎児纖維芽細胞（MEF）上に培養した細胞を移して培養を続ける。ここで述べているように、精子幹細胞は、継代を2~3回繰り返した後、すなわち培養開始から遅くとも4週間経過後までには、マウス胎児纖維芽細胞（MEF）
15 上に移されることが好ましい。

(5) 培養開始後、3~4週間で生殖細胞のコロニーは安定し、以後数ヶ月にわたり、3~5日の間隔で1/3~1/4の希釀でトリプシン処理によって継代する。

上述のような手順に基づいて、in vitro でマウスの精子幹細胞の増殖を行うと、
20 後述の実施例に示されるように、培養の初めから比較すると、5ヶ月間で 10^{14} 倍まで増殖することができる。

なお、マウスの精巢内の精子幹細胞の数は極めて少なく、精巢の細胞1万個当たりわずか約2~3個と見積もられている。この精子幹細胞を、従来法に基づいて in vitro で培養しても、1週間程度で初めの数の約20%程度に減ってしま
25 い、幹細胞の増殖を起こす条件が見つからなかった。そのため、発生工学的に多くの利用可能性が考えられたにもかかわらず、精子幹細胞を発生工学的に利用することは困難であった。

これに対し、本発明の精子幹細胞の増殖方法によれば、長期的かつ大幅な細胞増殖が可能となった。さらに、本増殖方法で得られた精子幹細胞は、実施例にも示されるように、不妊マウスの精細管の中に移植することによって、当該精子幹細胞由来の精子形成が長期に渡って起こり、その精子由来の仔をつくることができる。すなわち、本発明の精子幹細胞の増殖方法によって得られた精子幹細胞由来の精子は、実際の精子として機能することが確認されている。

それゆえ、本増殖方法によって得られた精子幹細胞は、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーという各分野における種々の技術開発のために有効に利用されることが期待できる。なお、この精子幹細胞の増殖方法は、精子幹細胞の持続的な増殖が確認されるとともに、それ由来の精子を形成し、さらにはその精子由来の仔をつくることができるということが明確に示された初めての手法である。

本実施の形態では、上述のように精子幹細胞の培養培地に、GDNF又はその均等物、EGF、bFGF、LIF、およびFCSが含まれている。しかし、本発明はこれに限定されるものではなく、上記培養培地中に、少なくともグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物、および白血病抑制因子（LIF）が含まれていればよい。これ以外の構成要素としては、従来から精子幹細胞等の培養に用いられてきたもの（例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）、血清など）を適宜使用することができる。上記培地の具体的な一例は、後述の実施例に示される。

なお、上記の精子幹細胞の培養方法においては、培養を確立させる際（すなわち、培養開始時）の培地として、GDNF又はその均等物、およびLIFは必須の要素であるが、培養が確立された後の培養を維持する際の培地（すなわち、継代後の培地）には、上記LIFは含まれていなくても細胞を維持することは可能である。しかし、継代後の培地に上記LIFが含まれることによって、精子幹細胞の増殖率をより上昇させることができる。

また、精子幹細胞の増殖率を高めるために、上記各成長因子および白血病抑制因子の培地中の濃度は、上記グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物については0.5～50ng/m¹が好ましく、上皮細胞成長因子（EGF）については0.5～50ng/m¹が好ましく、上記塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）については0.5～50ng/m¹が好ましく、上記白血病抑制因子（LIF）については10²～10⁴units/m¹が好ましい。
5

また、上記血清については、培養開始時の培地（すなわち、試験管培養における第1回目の培地）中に、濃度0.1～5(v/v)%という低濃度で含まれることによって、精子幹細胞の培養を安定して確立させることができる。なお、それ以外の培地（すなわち、継代後の培地）では、より高濃度の20(v/v)%程度まで含まれていてもよい。
10

また、別の局面では、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記血清が培地中に含まれる場合、当該血清は、上記精子幹細胞を継代した後の培地中に濃度10～20(v/v)%、好ましくは、15～20(v/v)%で含まれていてもよい。この場合、培地に上記上皮細胞成長因子（EGF）および塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）のうちの何れか若しくは両者が含まれなくとも、極めて安定した精子幹細胞の培養が達成され得る。
15

そして、上記各成長因子および白血病抑制因子の培地中の濃度は、上記グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物については2～20ng/m¹がより好ましく、上皮細胞成長因子（EGF）については2～30ng/m¹がより好ましく、上記塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）については2～20ng/m¹がより好ましく、上記白血病抑制因子（LIF）については3×10²～5×10³units/m¹がより好ましい。また、精子幹細胞の培養開始時の培地において、上記血清の濃度は、0.5～2(v/v)%であることが好ましい。上記の濃度で各因子が培地中に含まれることによって、精子幹細胞の培養を確実に確立させ、精子幹細胞の増殖率をより一層高めることができる。
20
25

続いて、本発明に係る精子幹細胞、すなわち、上記の培養方法によって増殖さ

れた精子幹細胞の利用方法について説明する。

本発明の精子幹細胞は、上記の増殖方法によって大幅に増殖されているため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。この精子幹細胞の主な利用方法には、以下に

5 示すようなものが挙げられる。

- (a) 新規なトランスジェニック動物の作製
- (b) ヒト男性の不妊治療
- (c) ヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療

上記 (a) では、精子形成の源となる精子幹細胞に外来遺伝子を導入するなどの操作を行い、その外来遺伝子が導入された精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行う。そして、得られた精子を卵細胞に受精させるという手法を用いてトランスジェニック動物を作製することができる。

より具体的には、精子幹細胞へ外来遺伝子を導入する方法としては、例えば、特定の遺伝子が機能的に発現できるように構築されたベクターを精子幹細胞に導入する方法が挙げられる。ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を用いることができる。また、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、センチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルス等が挙げられる。

20 ベクターを精子幹細胞に導入する方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法が挙げられる。ウイルスをベクターに用いる場合には、上述の一般的な遺伝子導入法によりウイルスのゲノムを細胞に導入してもよいし、ウイルス粒子を、細胞へ感染させることによっても、該ウイルスのゲノムを25 細胞に導入することができる。

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法を用いれば、外来遺伝子が安定に導入された精子幹細胞を選択することができる。例えば、ベクターと同時にマーカー遺

伝子を精子幹細胞へ導入し、マーカー遺伝子の性質に応じた方法で精子幹細胞を培養すればよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主精子幹細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、ベクターが導入された精子幹細胞を培養すれば良い。薬剤耐性付与遺伝子と選抜薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシン (G 4 1 8) との組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンとの組み合わせ、プラストサイジンS耐性付与遺伝子とプラストサイジンSとの組み合わせなどをあげることができる。

また、同様の方法を用いて、特定の遺伝子を欠損した精子幹細胞を得ることも可能である。特定の遺伝子を欠損した精子幹細胞を得る方法としては、例えばターゲッティングベクターを用いた相同的組換え（ジーンターゲッティング法）が挙げられる。即ち、特定の遺伝子の染色体DNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは lac Z (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のインtron部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすること等によって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（ターゲッティングベクター）を、相同組換え法により精子幹細胞の染色体に導入し、得られた細胞について当該特定の遺伝子のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した特定の遺伝子のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、特定の遺伝子を欠損した精子幹細胞を選択することにより得ることができる。或いは、組織特異的または発達段階特異的な様式で特定の遺伝子を欠失させるCre-1oxP系等を用いてもよい (Marth, J. D. (1

996) Clin. Invest. 97: 1999-2002; Wagner, K. U. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25: 4323-4330)。

5 このようにして得られた、外来遺伝子が導入された精子幹細胞、特定の遺伝子を欠失した精子幹細胞を、不妊動物等の精細管に移植することによって、精子形成を行い、得られた精子を卵細胞と受精させるという手法を用いてトランスジェニック動物を作製することが出来る。

10 この手法は、ES細胞を利用したトランスジェニック動物の作製方法と同様のものであるが、ES細胞では、生殖系列以外の細胞に分化する多能性があり、精細管に移植した場合に癌化する危険性を有している。それに対し、本発明の精子幹細胞を用いた場合には、精細管に移植しても癌化することなく、正常な精子を形成することができる。それゆえ、上記精子幹細胞を用いれば、簡単に効率よくトランスジェニック動物を作製することができる。この精子幹細胞を用いたトランスジェニック動物の作製は、現在有効な作製方法が見出されていない家畜動物や靈長類などの哺乳類におけるトランスジェニック動物の作製方法として利用15 できる可能性を有している。

15 上記 (b) では、例えば、不妊患者の精巣からバイオプシーで精子幹細胞を採取し、本発明の増殖方法によって試験管中で培養させる。そして、当該不妊患者の精細管中に増殖した精子幹細胞を注入 (マイクロインジェクション) して、患者の精巣の精細管の中に培養細胞由来の精子形成を起させるという手法によつ20 て、実施することができる。この手法は、例えば、化学療法や放射線治療によつて不妊になった場合に、特に効果的である。

25 このように、上記精子幹細胞はヒト男性の不妊治療に利用可能であるため、上記精子幹細胞を含む特に男性を対象とした不妊治療剤も本発明の範囲内である。

25 上記 (c) のヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療とは、例えば、特定の遺伝子が変異を持っている場合に、この遺伝子を正常に機能する遺伝子と置き換えて精子幹細胞を作製し、その変異が子孫に伝わらないようにするという治療方

法である。このような治疗方法においても、精子幹細胞の維持および増殖が必要となるが、この場合に、本発明の精子幹細胞の増殖方法を有効に利用することができる。

次に、本発明に係る培地添加剤キットについて説明する。本発明の培地添加剤
5 キットは、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物と、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）のうちの少なくとも何れか一方とを含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用されるものである。そして、この培地添加剤キットには、白血病抑制因子（LIF）がさらに含まれることが好ましい。また、上記培地添加剤
10 キットは、上記血清をさらに含むことができる。

上記培地添加剤キットは、精子幹細胞を培養する際に、通常用いられる細胞培養培地に添加して使用することができる。この培地添加剤キットを添加することによって、精子幹細胞を *in vitro* で大幅に増殖させることができる。より具体的には、実施例の場合であれば、5ヶ月間で 10^{14} 倍に増殖させることができる。
15 また、このようにキットとして各成長因子、白血病抑制因子および血清が適当な混合割合で含まれているため、精子幹細胞の培養を簡便に行うことが可能となる。

なお、上記培地添加剤キットに白血病抑制因子（LIF）がさらに含まれることによって、特に精子幹細胞の培養開始時の培養培地への添加剤キットとして有効に利用できる。それに加えて、精子幹細胞の増殖率をより上昇させることができるとともに、LIFを別途添加する必要もなくなり培地の作製をより簡便化することができる。

なお、上記培地添加剤キットに含まれる各成長因子、白血病抑制因子および血清の混合割合は、精子幹細胞培養培地に添加された場合の各因子の培地中の濃度が、上述の好適な範囲に入るように構成されていることが好ましい。また、上記培地添加剤キットには、上記の物質以外に、上記各物質を安定して維持するためのインスリン、トランスフェリン、BSA、2-ME、エストラジオール、プログesteronなどが適宜含まれていてもよい。

以下、本発明の実施例について、図面を用いて説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

実施例 1

5 [1] 実験方法および実験材料

(1) 実験に用いた動物について

先ず、本実験に使用された動物について説明する。

精巣細胞は、大阪大学の岡部博士より提供されたトランスジェニックマウス系統 C 5 7 B L 6 / T g 1 4 (act-EGFP-OsbY01) と、 D B A / 2 というマウスの系統とをかけあわせて得られた、生まれたばかりのマウスから、2段階酵素分解によって集められ、培養に使用された (参考文献 1: Okabe M et. al., 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, FEBS Lett, 407 卷、313-319 頁、1997 年)。これらのマウスの精原細胞および精母細胞 E G F P 遺伝子を発現し、その発現レベルは減数分裂後に徐々に減少する。それゆえ、ドナー細胞は後に行われる移植を容易に特定することができる。

培養された細胞は、 B A L B / C ヌードマウスあるいは W 仔マウス (生後 5 ~ 10 日、 Japan SLC 製) へ移植された。内因性の精子形成を避けるために、ヌードマウスは、生後 6 週間の時期にブスルファン (4.4 mg / kg) で処理され、 続いて、死亡率を抑えるために対応する骨髄細胞が注射された。 W 受容体 (レシピエント) を使用した実験では、 50 μ g の抗 C D 4 抗体 (G K 1. 5) が、移植から 0 、 2 、 4 日後に腹腔内に投与され、異質遺伝的なドナー細胞への耐性が誘導された。全ての動物実験のプロトコルは、京都大学の動物保護および使用制度委員会によって承認されたものである。

(2) 培養条件

25 続いて、本実験における精子幹細胞の培養条件について説明する。

分離された精巣細胞は、ゼラチンコートされた細胞培養プレートに配分された。

精巣細胞用の培養培地は、 StemPro サプリメント (Invitrogen 製)、 25 μ g /

ml インスリン、100 μ g/ml トランスフェリン、60 μ M プトレシン、30 nM セレン酸ナトリウム、6 mg/ml D-(+)-グルコース、30 μ g/ml ピルビン酸、1 μ l/ml DL-乳酸(シグマ製)、5 mg/ml ウシアルブミン(ICON バイオメディカル製)、2 mM L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、MEM非必須ビタミン溶液(Invitrogen 製)、10⁻⁴ M アスコルビン酸、10 μ g/ml d-ビオチン、30 ng/ml β -エストラジオール、60 ng/ml プロゲステロン(Sigma 製)、20 ng/ml マウス上皮細胞成長因子(EGF: Becton Dickinson 製)、10 ng/ml 塩基性纖維芽細胞成長因子(bFGF: Becton Dickinson 製)、10³ units/ml ESGRO(マウス白血病抑制因子: LIF、Invitrogen 製)、10 ng/ml 組換えラットGDNF(R&Dシステムズ製)、1(v/v)%仔ウシ血清(JRH バイオサイエンス製)が添加された StemPro-34 SFM(Invitrogen 製)を使用した。細胞は5%の二酸化炭素を含む空气中で、37°Cで維持された。

15 (3) 抗体染色

上記(2)の培養条件で培養された細胞の性質を確認するために、従来公知の精子形成細胞に対する分子マーカーの発現を調べるフローサイトメトリーが、以下のようにして実施された。

一次抗体として、ラット抗EpCAM(G8.8)、マウス抗SSEA-1(MC-480)(発生研究ハイブリドーマバンク、アイオワ大学)、ラット抗ヒト α 6-インテグリン(CD49f)(GoH3)、ビオチン標識された抗ラット β 1-インテグリン(CD29)(Ha2/5)、APC-接合ラット抗マウスc-kit(CD117)(2B8)(BDバイオサイエンス製)、ラット抗TDA抗体(EE2)(大阪大学西宗博士から提供)、APC-接合ヤギ抗ラットIgG(Cedarlane研究所製)が使用された。

25 APC-接合ヤギ抗ラットIgG(Cedarlane研究所製)、APC-接合ストレプトアビジン(BDバイオサイエンス製)、あるいは、Alexa Fluor 633-接合ヤギ抗マウスIgM(Molecular Probe 製)が、二次抗体として使用された。細胞染色技術は、参考

文献2 (Shinohara T, Avarabock MR, Brinster RL $\beta 1$ -and- $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells, Proc Natl Acad Sci USA, 1999年、96巻、5504-5509頁) の記載に従って実施した。細胞は FACS-Calibur システム(BD バイオサイエンス製)で分析した。

5 (4) 培養された精子幹細胞の移植

上記の培養方法によって得られた精子幹細胞を含む約 $8 \mu 1$ のドナー細胞懸濁液は、ヌード受容体(レシピエント)精巣の精細管に注入された。 $2 \mu 1$ のドナー細胞懸濁液は、輸出管を通してW仔マウスの精巣へ導入された。各受容体(レシピエント)の精巣では、注入物が細管の75~80%を占めた。成体の受容体(レシピエント)マウスは、アバーテインインジェクソン(640mg/kg)によって麻酔された。

10 コロニーをカウントするために、受容体(レシピエント)マウスのテストでは、ドナー細胞移植後7~8週間で受容体(レシピエント)精巣を摘出し、紫外線下で蛍光を観察することによって解析された。ホストの精巣細胞は内因性の蛍光発15 光を有しないため、ドナー細胞は、明確に特定された。細胞の集団は、精細管の全周囲を占め、少なくとも0.1mmの長さを有する場合に、コロニーと定義された。

(5) 顕微受精

受容体(レシピエント)マウスの精巣の中から培養細胞由来の精子を取り出し、20 以下のような方法で顕微授精が実施された。

移植実験の精細管は、精密に分析され、精子形成細胞は機械的に集められた。顕微受精は、参考文献3 (Kimura Y, Yanagimachi R, Intracytoplasmic sperm injection in the mouse, Biol Repord, 1995年、52巻、709-720頁) に記載のように実施された。培養において24時間経過後の四細胞段階に達した胚(胎児)25 は、day-1の偽妊娠したICR雌の輸卵管へ移送された。19.5日目に取り出された生育胎児は、ICR親マウスの授乳によって育てられた。

[2] 結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下の（1）から（4）に示す。

（1）マウス精子幹細胞の試験管内培養について

新生児D B A／2マウスの精巣細胞は、酵素学的に分散され、G D N F、b F 5 G F、E G F、L I F、F C Sを含むゼラチンコートされたプレート培地へ移された。G D N Fは、生体内で精子幹細胞の自己再生を刺激することが知られている。その他の因子は、始原生殖細胞（P G C）を含む他の幹細胞の増殖や維持に影響を与えるということが知られている。

本実験における培養の結果、多くの細胞は、一晩のインキュベーション後にプレートに付着した。しかし、サイズが大きく、仮足があつたりすることで特徴的に認められる、少なからずの生殖細胞が、浮遊したままであった。浮遊している細胞は、活発なピペッティング後に第2培養プレートへ継代された。ほんのわずかの生殖細胞だけ元のゼラチンコートされたプレートに残され、第2プレートへ継代された細胞は比較的濃縮された生殖細胞（図1（a）の矢印でしめすもの） 10 であった。継代された細胞は一週間以内で増殖してプレートの底に拡がり、丸く増殖した細胞は平坦な細胞層の上部でコロニーを形成した（図1（b）、（c）参考）。これらの一次コロニーの多くは、不鮮明な境界の密集した群から成るもの 15 であった（図1（c）参考）。細胞分裂およびコロニーの形成は、上述の成長因子なしでは起こらなかった。

細胞はトリプシン処理によって分散され、10～14日間隔（この間隔をD I 20 Vと称する）で、生体外の新しい培養プレート（×1希釈）へ移された。コロニーは、約10日で本来の大きさに成長し、細胞は再び継代された（×1／2希釈）。コロニーが成長を続ける一方で、20 D I V後には、平坦な形状の体細胞は徐々に消滅していった。それゆえ、2度目あるいは3度目の継代から、細胞はマイト 25 マイシンCで不活性化されたマウス胎児纖維芽細胞（M E F）で維持され、3～5日毎に1／3から1／4希釈の新しいM E Fへ継代された。3～4週間までには、培養は比較的安定した状態に落ち着き、類似した形態のコロニーを発生させ

た。(図1 (d) 参照)。興味深いことに、生体内で有糸分裂をする精原細胞と類似して増殖する細胞の鎖は、継代後にも観察される場合があった(図1 (e) 参照)。また、図1 (e)において矢印で示すように、細胞の間に細胞間架橋が観察された。

5 これらの結果は再現性を有し、同様の培養が20以上の別の実験から確立された。しかし、コロニーの派生はマウスの遺伝的背景により影響を受けた。つまり、ICRあるいはC57BL/6×DBA/2F1 (BDF1) から培養を開始することで、効率よくコロニーを派生することができたが、C57BL/6あるいは129/Sv系統からのコロニーの派生は効率が低かった。

10 この実験における培養細胞(すなわち、精子幹細胞)の増殖の様子を図2のグラフに示す。このグラフにおいて、横軸は培養開始からの経過日数を、縦軸には細胞数を示す。図2に示すように、約5ヶ月間にわたって細胞培養は継続され、ログ・スケールで細胞増殖が持続することが確認された。また、培養開始から5ヶ月間で細胞数は約 10^{14} 倍に増殖した。

15 以上の結果から、GDNF、bFGF、EGF、LIFという成長因子および白血病抑制因子の組合せは、試験管内(in vitro)において、幹細胞の可能性を有する精原細胞の増加を誘導することが示された。この結果に基づいて、増加した細胞を生殖系列幹細胞(GS細胞)と命名した。

(2) 培養細胞の性質について

20 培養された細胞の性質を評価するために、新生児グリーンマウス(Green Mouse)の精巣細胞が使用された(参考文献1参照)。これらのマウスのGFP遺伝子は、精原細胞を含むあらゆる場所で発現する。それゆえ、培養されたGFPを含む細胞は、UV照射下での観察によってフィーダー細胞から区別することができる。細胞培養はグリーンマウスから確立され、GFPを含む細胞の表面の特徴はフロ25 ーサイトメトリーによって解析された。

その結果を図3 (a)～(f)に示す。図3に示す各図は、(a)から順に α 6-インテグリン、 β 1-インテグリン、EpCAM、EE2、c-kit、SSE

A-1 という分子マーカーを用いて解析を行った結果である。なお、黒の実線で囲む白色のものがコントロール免疫グロブリンの場合の結果であり、灰色で示すものが各分子マーカー（抗体）の場合の結果である。

培養された細胞は、 α 6-インテグリンおよび β 1-インテグリン（精子幹細胞マーカー）、E p C A M（精原細胞マーカー）、E E 2（精原細胞マーカー）に5 対してポジティブであった。

また、多くの細胞は c-kit（分化した精原細胞マーカー）に対してネガティブであったが、弱い発現が確認され、これによっていくつかのコロニーが分化していることが示唆された。しかし、培養に c-kit リガンド S C F を加えることによって、コロニーの特徴や成長特性は変化しなかった。培養された細胞は S S E A 10 -1（P G C マーカー）に対して完全にネガティブであった。これらの結果から、細胞の大部分は未分化の精原細胞の性質を有するということが分かった。

（3）精原細胞移植による幹細胞活性の決定

上記（2）の結果に基づき、続いて、培養された細胞が本当に精子幹細胞であるか確認するために、精原細胞移植が実施された。

精子幹細胞には、形態学上のはっきりした判定基準あるいは特異的マーカーがないため、信頼できる唯一の分析法は、不妊動物での精子形成の回復を確認することである。この実験では、グリーンマウスからの 3 つの分離培養（実験 1、2、3）が確立された。さらに、試験管中で幹細胞が増殖しているかを確認するため 20 に、異なる 2 つの時点で不妊マウスの精細管の中に細胞を移植し、形成されるコロニー数を測定した。

具体的には、29～58 日の培養期間経過後、細胞は収穫され、ブスルファン処理されたヌードマウスの精細管へ移植された。また、4～21 繼代後に、細胞は移植のために 45～134 D I V で再びあつめられ、この期間中の幹細胞数の 25 増加の測定が行われた。移植実験におけるコロニーは、移植から 7～8 週間後に U V 照射下で測定された。

その結果を表 1 に示す。幹細胞数は 3 つの実験全てで増加していた。

表1

実験	移植後の日数	精巢に注入された 精巢における (懸代数)	コロニー数／ 10^5 細胞 ($\times 10^5$)	コロニー数／ 10^5 細胞 (平均土標準誤差)		細胞数の増加 (倍)	幹細胞数の 増加(倍)
				(平均土標準誤差)	(倍)		
1	46 (6)	2.0	33.6±2.0	16.8±1.0	6.9×10 ⁷	1.9×10 ⁷	692
	107 (21)	1.6	7.4±2.9	4.6±1.8	127		
	134 (27)	0.3	7.6±4.1	25.2±13.8			
2	29 (3)	3.4	67.4±11.1	20.1±3.3	38.0	11.2	29
	45 (7)	1.6	9.5±0.9	5.9±0.5			
	58 (9)	2.0	7.5±3.7	3.8±1.9			
3	113 (22)	0.4	3.2±2.1	8.0±5.2	2.0×10 ⁶	4.2×10 ⁶	4.2×10 ⁶

新生児の精巣における幹細胞の数は、 10^5 細胞につき3、4個であるので、この結果からも培養開始から134日間で幹細胞が約 5×10^{12} 倍に増加したことが示される。またこの実験において、幹細胞活性を有する最長の培養は、移植分析によって確認されるように、27継代（ 7×10^{11} 倍の増加）で134日間維持され、細胞は160日以上（トータルの細胞数で 2×10^{14} 倍の増加）、特徴的な形態を保持しながら成長を続けた（図2参照）。これらの結果は、細胞がその数を積極的に増加させていることを示すものである。

（4）培養幹細胞を移植された不妊の雄における生殖力の回復

最後に移植実験で発生した生殖細胞が正常であるかどうかを確認するために、不妊のWBB6F1W/W^v（Wと称する）において、培養細胞移植によって生殖力が回復するか試みられた。これらのマウスはc-kit遺伝子欠陥によって、生まれつき生殖力を欠いている。

ここでは、2つの実験が実施された。精巣細胞は第1の実験では40日間、第2の実験では91日間培養され、両方の実験ともに免疫抑制された遺伝的な系統の異なる3つのW仔マウス（生後5～10日）へ移植された。移植後40日で第1の実験における受容体（レシピエント）Wマウスの一匹が殺され、組織学的解析および生体外顕微受精に使用された。維持されたW受容体（レシピエント）は、生殖力を回復するかどうかを決定するために野生型の雌と自然交配された。

本実験によって得られたW受容体（レシピエント）精巣の解析では、外見上正常な精子形成細胞を有する多数の精細管で満たされた培養細胞によって、広大なコロニー形成が行われることが実証された（図4（a）、（b）参照）。成熟した精子が観察された（図4（c）参照）。W受容体（レシピエント）は欠陥を有する幹細胞において精子を形成することができないので、移植実験でのホストマウスにおける精子形成は、培養されたドナー幹細胞由來のもののみである。子孫を発生するために、68個の生きた精子あるいは139個の伸長した精細胞が、他のWの精巣から集められ、CDF1卵母細胞へ注入された。構築された207の胚のうち、培養において172個（83%）が24時間以内に2細胞へ分化した。

11匹の偽妊娠した雌の輸卵管への移入後に、全部で59匹の子が生まれた（17匹の雄、29匹の雌、生後母マウスに食べられたものは含まず）。子孫は自然交配によっても獲得された。第1の実験では2つの受容体（レシピエント）のうちの一つが、移植後74日目に7匹の子（雄3匹、雌4匹）を産んだ。そして、
5 第2の実験では、3つの受容体（レシピエント）のうちの一つが、移植後91日目に9匹の子（雄5匹、雌4匹）を産んだ。両方の実験では、仔の起源となるドナーがUV照射下で蛍光によって確認された（図4（d）参照）。仔は生殖能力を有していることが確認された。これらの結果から、培養細胞から分化した生殖系列は精子を形成することができ、正常な子孫を残すことができる事が確認さ
10 れた。

実施例2

〔1〕実験方法および実験材料

（1）実験に用いた動物について

15 先ず、本実験に使用された動物について説明する。

精巣細胞は、DBA/2マウスの新生児から、実施例1と同様の方法により2段階酵素分解によって集められ、培養に使用された。

Wマウス（生後5～10日）がレシピエントとして用いられた。また、レシピエントと交配する雌マウスには、野生型C57BL/6マウスが用いられた。

20 DBA/2マウス、WマウスおよびC57BL/6マウスは日本SLC（浜松、日本）より購入された。

（2）培養条件

分離された精巣細胞を用いて、実施例1と同様の条件より培養細胞（精子幹細胞）が樹立された。

25 ネオマイシン耐性遺伝子とCAGプロモーターに機能的に連結されたEGFP構造遺伝子（pCAG-EGFP）を保持するpCXNを基礎とするプラスミドベクターが遺伝子導入に使用された。リポフェクションに際しては、製造会社

の指示書に従い、Fugene 6 トランスフェクション試薬(Roche 製)により、精子幹細胞がトランスフェクトされた。分離された精子幹細胞は 2×10^6 細胞 / 55 cm^2 の密度で、7 ml の培地中に播種され、9 μg のプラスミドDNA と 27 μl のFugene 6と共に培養された。G418選択 (20–40 μg / ml、ジェネチシン；インビトロゲン社製) がトランスフェクションから 2 日後に開始された。G418選択における精子幹細胞の培養条件は、培地に G418 を添加することを除いて、実施例 1 の培養条件と同様である。G418 による 10 日の選択後、培養が継代された。あるいは、コロニーがピックアップされ、クローナルに増幅された。精子幹細胞の成長は密度により影響されるので、個々のコロニーは、1000 個のトランスフェクトされていない精子幹細胞と混合され、96 穴 ME F 培養プレートに移された。改変された細胞は、G418選択及び混合手順を繰り返しながら、増幅された。2~3 カ月後、生き残ったコロニーが増幅され、移植のために十分な細胞数が獲得された。

(3) 培養された精子幹細胞の移植

上述の方法で遺伝子導入された精子幹細胞が W 仔マウスへ移植された。約 2 μl のドナー細胞懸濁液 ($3 \sim 5 \times 10^7$ / ml) は、輸出管を通して W 仔マウス レシピエントの精巣管に注入された。各レシピエントの精巣では、注入物が細管の 75~80% を占めた。低体温誘導麻酔を施すため、レシピエントは氷上に置かれた。50 μg の抗 CD4 抗体 (GK1.5) が、移植から 0、2、4 日後に腹腔内に投与され、異質遺伝的なドナー細胞に対する寛容が誘導された。全ての動物実験のプロトコルは、京都大学の動物保護および使用制度委員会によって承認されたものである。

(4) DNA 解析

G418選択の結果、G418 に耐性な精子幹細胞コロニーの染色体DNAがサザンプロットティングにより解析された。また、レシピエント雄性マウスは、野生型 C57BL/6 雌性マウスと交配され、子孫の染色体DNAが同様に解析された。

G 4 1 8 耐性精子幹細胞、あるいはマウス尾組織から単離された染色体DNA (8 μ g) は一晩中、Sph Iにより消化され、電気泳動により分離され、ナイロン膜 (Hybond-N⁺、アマシャムファルマシア製) 上にプロットされた。全長EGFP cDNAを含むEGFPプローブが、ハイブリダイゼーションに用いられた。ハイブリダイゼーションは「Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) , Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9.31-9.62」等に記載の通常の条件で行われた。

[2] 結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下に示す。

10 (1) 遺伝子導入精子幹細胞の樹立

精子幹細胞にネオマイシン耐性遺伝子とCAGプロモーターに機能的に連結されたEGFP構造遺伝子 (pCAG-EGFP) を保持するpCXNを基礎とするプラスミドベクターを導入し、G 4 1 8選択を行うことにより、EGFP遺伝子が導入された、安定で、クローナルな、遺伝子導入精子幹細胞が樹立された。

15 精子幹細胞の染色体DNAにEGFP遺伝子が導入されていることは、サザンブロッティング解析により立証された (図5、レーン1)。

(2) 遺伝子導入マウスの作製

EGFP遺伝子が導入された精子幹細胞をWマウスへ移植し、当該Wマウスを野生型C57BL/6雌性マウスと自然交配することにより、その子孫を得た。

20 当該子孫の染色体DNAに、精子幹細胞に由来するEGFP遺伝子が導入されていることは、サザンブロッティング解析により立証された (図5、レーン2~4)。また、当該子孫が、EGFP遺伝子が導入された精子幹細胞由来であることは、UV照射下の蛍光によっても確認された (図6)。

これらの結果から、本発明の精子幹細胞の増殖方法を用いることにより、精子幹細胞に外来遺伝子を導入できること、外来遺伝子が安定に導入された精子幹細胞を選択できることが確認された。また、当該精子幹細胞を用いて、外来遺伝子が導入された動物 (トランスジェニック動物) を製造できることが確認された。

実施例 3

〔1〕実験方法および実験材料

実施例 1 と同様の方法により確立された G S 細胞（培養細胞）を、組換えラット G D N F に換えて、組換えヒトノルトリン（和光純薬工業社製）を $3.0\text{ ng}/\text{mL}$ の濃度で含む培養培地を用いて引き続き培養し、当該 G S 細胞の増殖、コロニー形成が維持されるか試験した。ノルトリンを含む培地に変換した 4 日後に、形成されたコロニーの形態を位相差顕微鏡を用いて観察し、培養細胞の細胞数を測定した。

〔2〕結果

G D N F に換えてノルトリンを含む培地を用いて確立された G S 細胞を培養した場合においても、G D N F を含む培地を用いた場合と同様に G S 細胞の増殖が確認され、コロニーの形成が認められた（図 7 a）。一方、コントロールとして G D N F およびノルトリンを含まない培地中で G S 細胞を培養しても、コロニー形成はほとんど認められなかった（図 7 b）。

また、確立された G S 細胞を G D N F を含まずノルトリンを含む培地中で培養すると、当該細胞は 4 日間で細胞数として 2.8×10^5 個から 3.7×10^5 個へ、1.3 倍の増殖を示した。これに対して、コントロールとして G D N F およびノルトリンを含まない培地中で G S 細胞を培養すると、当該細胞数は 4 日間で 2.8×10^5 個から 5.7×10^4 個へ、0.2 倍に減少した。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、これまで生体外（すなわち、*in vitro*）で長期間増殖させることができなかった精子幹細胞を増殖させることが可能となる。これによって、各分野への応用が期待されていながら、これまで効率的な増殖方法が見つかりていなかったために、その応用範囲が制限されていた精子幹細胞を有効に利用することが可能となる。

そして、上記の方法によって得られた本発明の精子幹細胞は、実用可能なレベルにまで増殖されたものであるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。

- 5 本出願は、日本で出願された特願2003-110821を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴とする精子幹細胞の増殖方法。
5
2. 上記培地には、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) のうちの少なくとも何れかがさらに含まれることを特徴とする請求項 1 記載の精子幹細胞の増殖方法。
3. 上記培地には、血清がさらに含まれることを特徴とする請求項 1 または 2
10 記載の精子幹細胞の増殖方法。
4. さらにフィーダー細胞を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
5. 哺乳類由来の精子幹細胞を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
15
6. 上記グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物は、濃度 0. 5 ~ 50 ng/m1 で上記培地中に含まれることを特徴とする請求項 1 ないし 5 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
7. 上記白血病抑制因子 (LIF) は、濃度 10² ~ 10⁴ units/m1 で上記培地
20 中に含まれることを特徴とする請求項 1 ないし 6 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
8. 上皮細胞成長因子 (EGF) は、濃度 0. 5 ~ 50 ng/m1 で上記培地
中に含まれることを特徴とする請求項 2 ないし 7 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
25
9. 上記塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) は、濃度 0. 5 ~ 50 ng/m1 で上記培地
中に含まれることを特徴とする請求項 2 ないし 8 の何れか 1 項に記載の精子幹細胞の増殖方法。
10. 上記血清は、上記精子幹細胞の培養開始時の培地中には、濃度 0. 1 ~

5 (v/v) %で含まれ、上記精子幹細胞を継代した後の培地中には、濃度0.1～20 (v/v) %で含まれることを特徴とする請求項3ないし9の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

11. 上記フィーダー細胞は、培養開始から遅くとも4週間経過後には用いられるることを特徴とする請求項4ないし10の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

12. 請求項1ないし11の何れか1項に記載の増殖方法を用いて、生体外で増殖された精子幹細胞。

13. 請求項12記載の精子幹細胞を含んでなる不妊治療剤。

14. グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物と、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) のうちの少なくとも何れか一方を含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用される培地添加剤キット。

15. 白血病抑制因子 (LIF) をさらに含むことを特徴とする請求項12記載の培地添加剤キット。

16. 血清をさらに含むことを特徴とする請求項14または15記載の培地添加剤キット。

17. 不妊治療剤を製造するための、請求項12記載の精子幹細胞の使用。

18. 請求項12記載の精子幹細胞を用いる、不妊の治療方法。

19. 以下の工程を含む、移植された精子幹細胞に由来する精子を形成する非ヒト動物の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程。

20. 以下の工程を含む、精子の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
- b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
- c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程。

2 1. 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する胚の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
- b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
- c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程；
- d) 当該精子を卵細胞に受精させ、胚を得る工程。

2 2. 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する非ヒト子孫の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；
- b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；
- c) 当該非ヒト動物から精子を得る工程；
- d) 当該精子を卵細胞に受精させ、胚を得る工程；
- e) 当該胚を偽妊娠した雌の輸卵管に移入し、非ヒト子孫を得る工程。

2 3. 以下の工程を含む、精子幹細胞に由来する非ヒト子孫の製造方法：

- a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

b) a) で増殖させた精子幹細胞を不妊非ヒト動物の精細管の中に移植し、当該精子幹細胞に由来する精子形成を起こした非ヒト動物を得る工程；

c) 当該非ヒト動物を雌と自然交配し、非ヒト子孫を得る工程。

24. 以下の工程を含む、外来遺伝子が導入された精子幹細胞の製造方法：

5 a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程。

10 25. 以下の工程を含む、外来遺伝子が導入された精子の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程；

c) 当該精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行い、外来遺伝子が導入された精子を得る工程。

26. 以下の工程を含む、トランスジェニック非ヒト動物の製造方法：

a) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物、および白血病抑制因子 (LIF) を含む培地を用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させる工程；

b) a) で増殖させた精子幹細胞に外来遺伝子を導入し、外来遺伝子が導入された精子幹細胞を得る工程；

c) 当該精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行い、外来遺伝子が導入された精子を得る工程；

d) 当該精子を卵細胞に受精させ、トランスジェニック非ヒト動物を得る工程。

27. トランスジェニック非ヒト動物がノックアウト非ヒト動物である、請求

項 2 6 記載の製造方法。

図1.

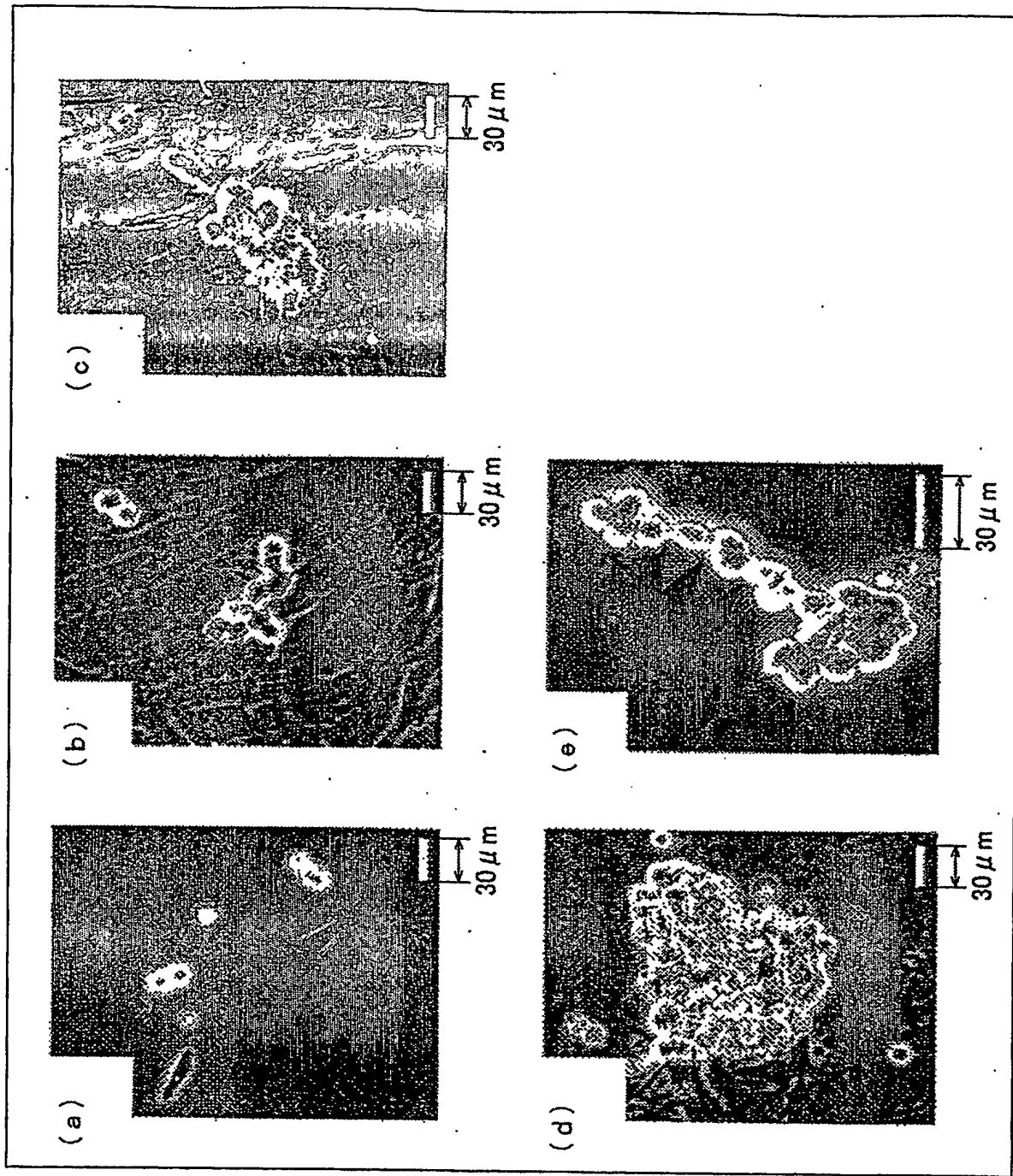


図 2

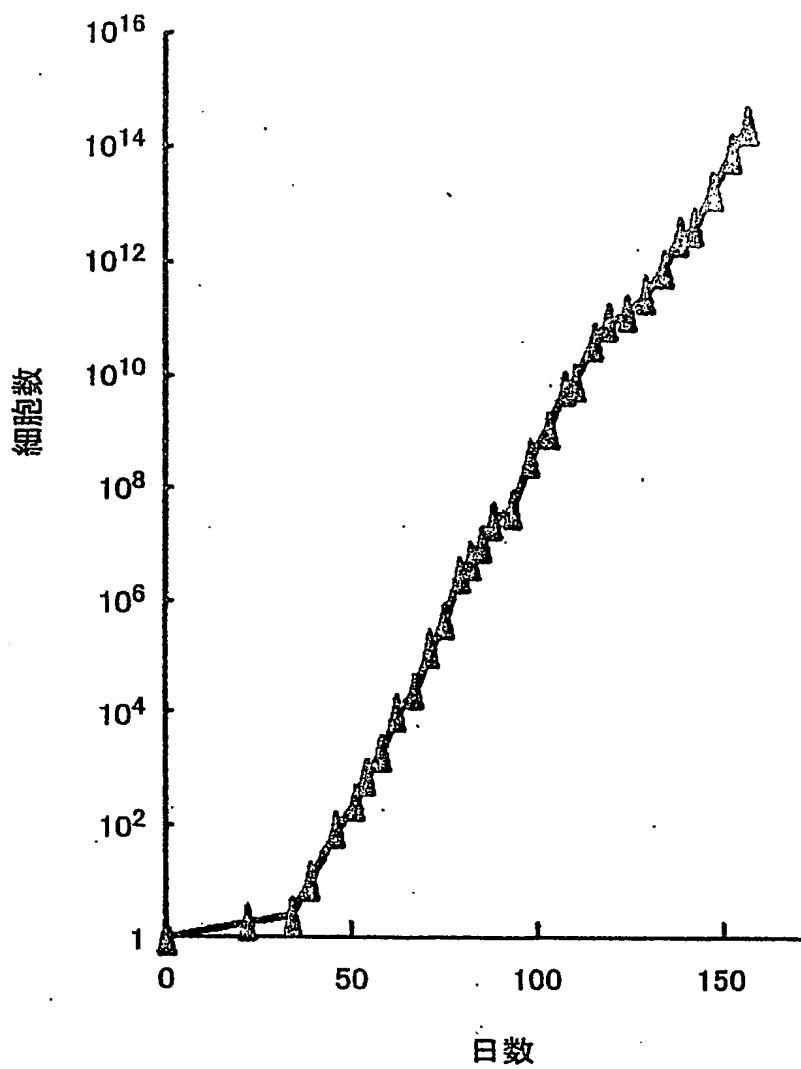
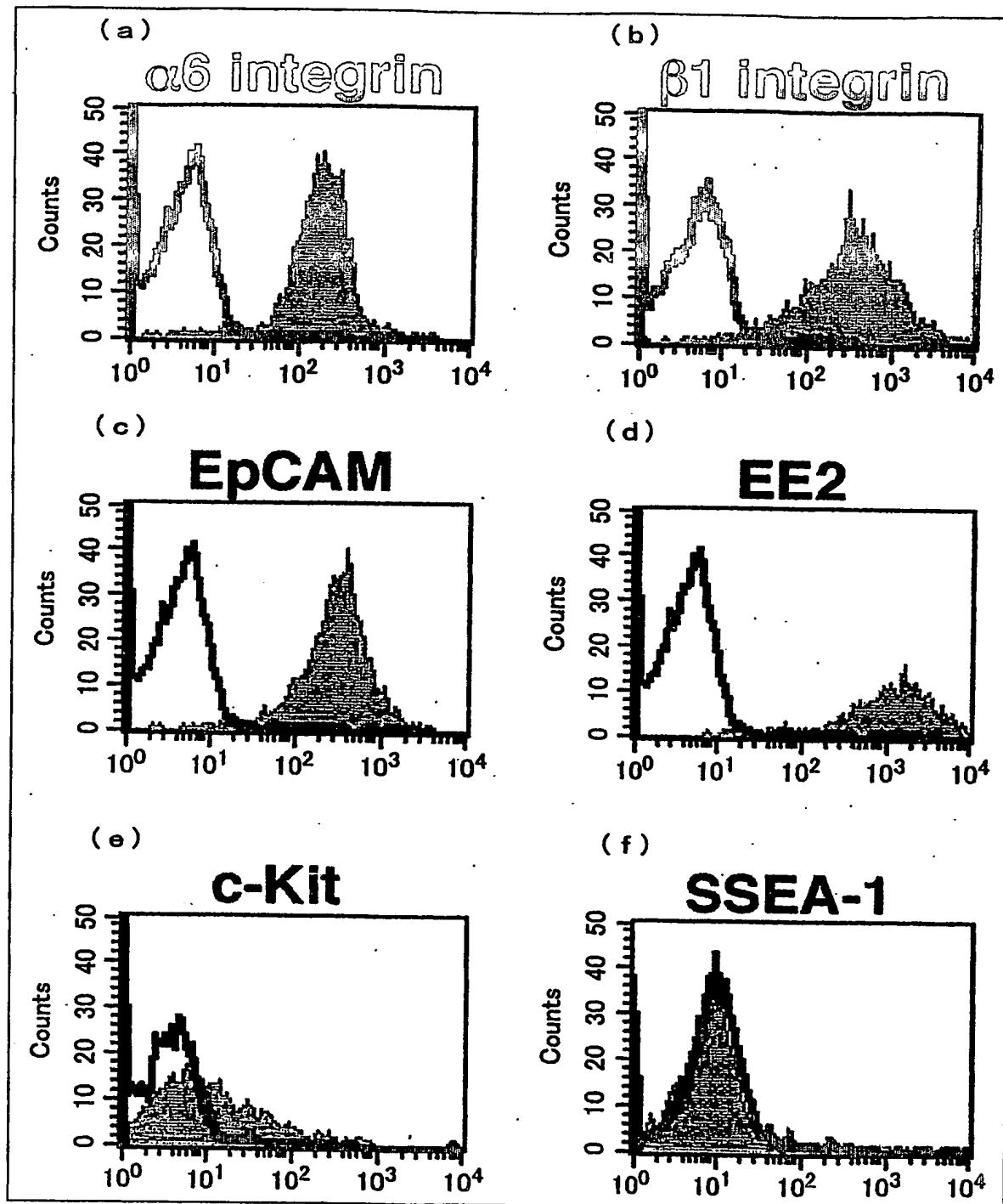


図 3



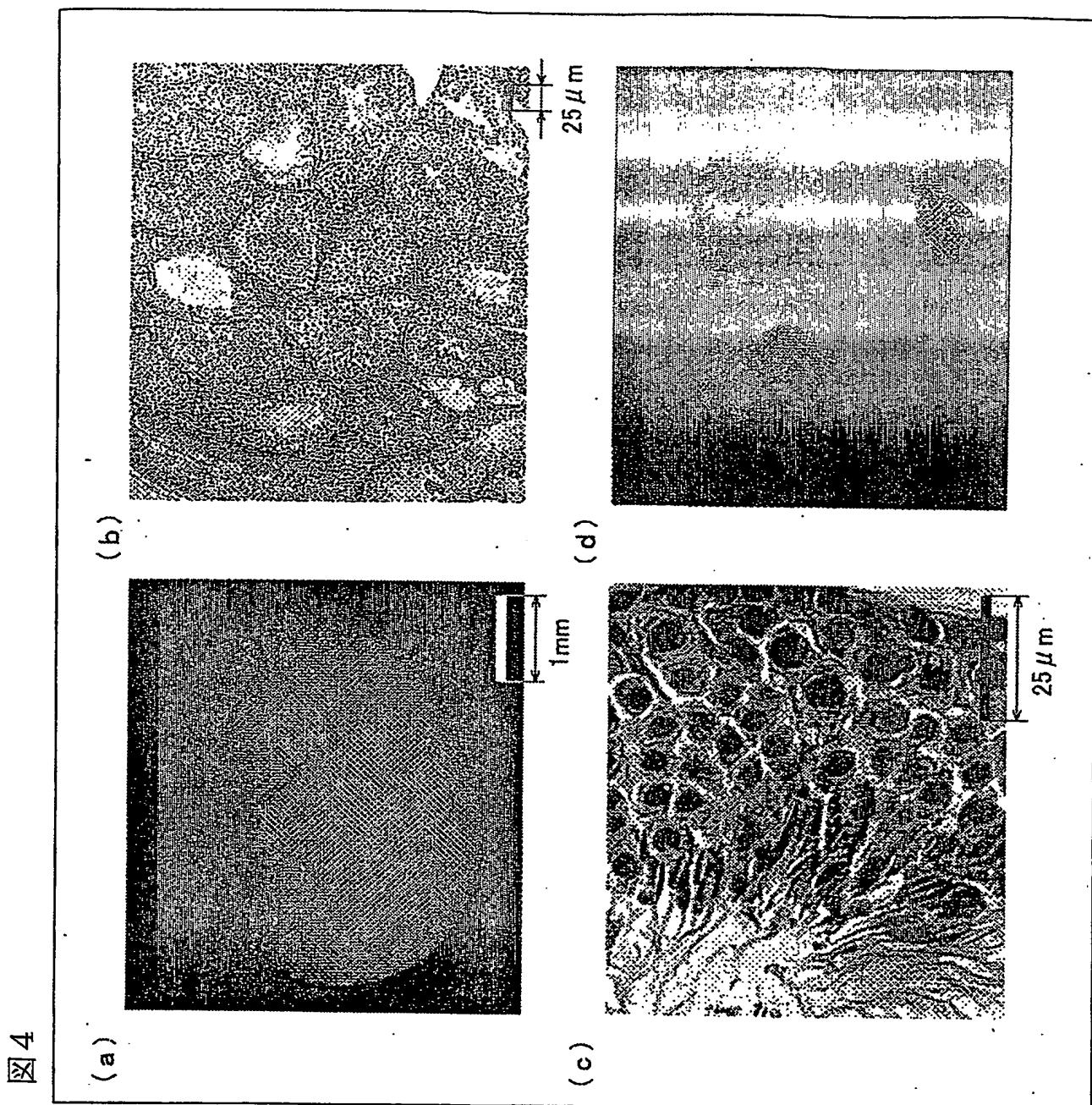


図 5

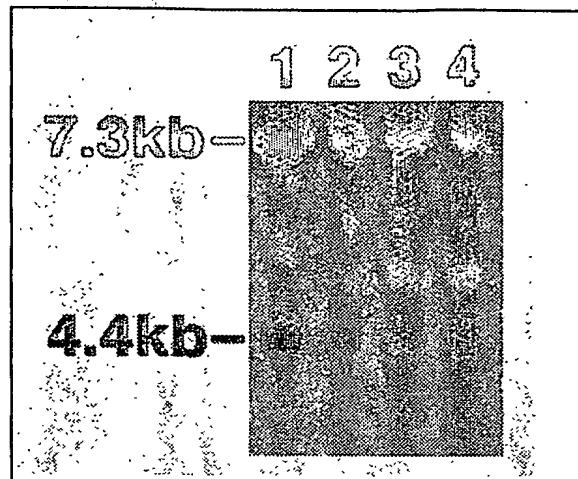


図 6

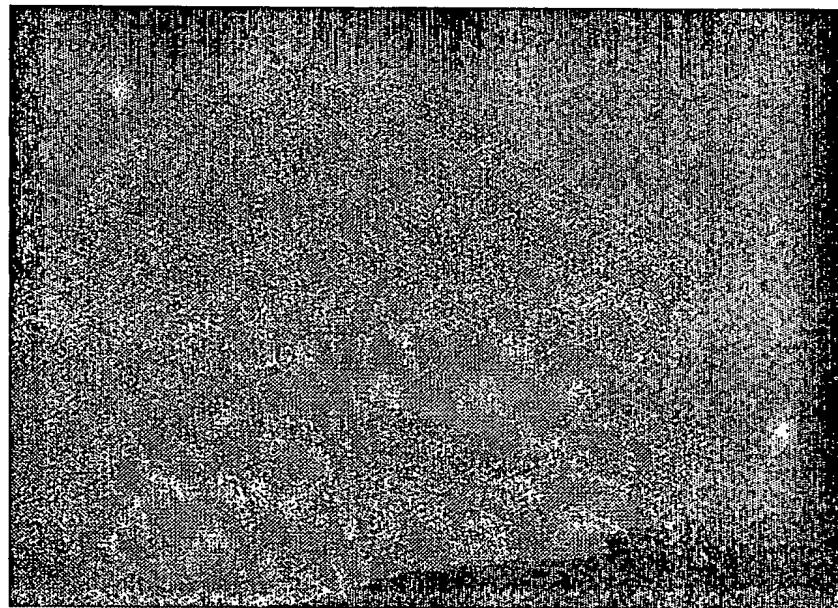
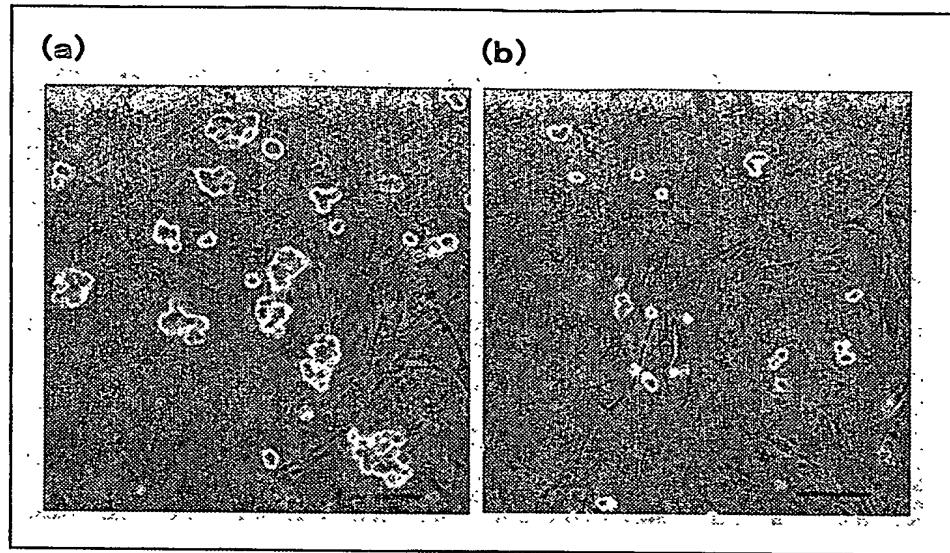


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61K48/00, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61K48/00, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Edited by Yukio NISHINA, "Haisei Kansaibo nadono Seitainai Ishokukei ni yoru Matsubunka Bunkajotai no Iji Kiko no Kaiseki", Life Science Fukko Zaidan Nenpo, Heisei 14 Nenban 01 March, 2003 (01.03.03), No. 17 to 19	1-16
Y		17,19-27
X	Sariola, H. et al., The neurotrophic factors in non-neuronal tissues., Cell.Mol.Life Sci., Vol.58, No.8, pages 1061 to 1066 (2001)	1-16
Y		17,19-27
X	Meng, X. et al., Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF., Science, Vol.287, No.5457, pages 1489 to 1493 (2000)	1-16
Y		17,19-27

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May, 2004 (17.05.04)Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Edited by Takashi SHINOHARA et al., "Saisei Igaku to Seishi Kansaibo; 'Jisedai' Kansaibo no Aratana Kanosei to Kikensei", Gendai Kagaku Zokan 41 Saisei Igaku·Saisei Iryo 01 July, 2002 (01.07.02), pages 24 to 28	12,13,17 17,19-27
Y	NAGANO, M. et al., Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.98, No.23, pages 13090 to 13095, (2001)	24-27
Y	NAGANO, M. et al., Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells., FEBS. Lett., Vol.475, No.1, pages 7 to 10, (2000)	24-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/004612

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claim 18 pertains to method for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61K48/00, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1' C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61K48/00, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JSTPlus(JOIS)、MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	仁科行雄著 胚性幹細胞などの生体内移植系による未分化・分化状態の維持機構 の解析 ライフサイエンス振興財団年報 平成14年版 (平成15年3月1日) 第17-19	1-16 17, 19-27
X Y	Sariola, H. et al., The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. Cell. Mol. Life Sci., Vol. 58, No. 8, pp. 1061-1066 (2001)	1-16 17, 19-27

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17. 05. 2004	国際調査報告の発送日 01. 6. 2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明照 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4N 8412

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Meng, X. et al.,	1-16
Y	Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science, Vol. 287, No. 5457, pp. 1489-1493 (2000)	17, 19-27
X	篠原隆司他著	12, 13, 17
Y	再生医学と精子幹細胞：“次世代”幹細胞の新たな可能性と危険性 現代化学増刊41 再生医学・再生医療 (2002年7月1日) 第24-28頁	17, 19-27
Y	Nagano, M. et al., Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, No. 23, pp. 13090-13095 (2001)	24-27
Y	Nagano, M. et al., Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. FEBS Lett., Vol. 475, No. 1, pp. 7-10 (2000)	24-27

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
人体の治療方法に係る発明が記載されている。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。